

文章编号 1000-2421(2006)05-0507-05

基于线粒体 16S rDNA 序列的蝽总科系统发育研究(异翅亚目:蝽次目)*

李红梅¹⁾ 王珣章²⁾ 林进添¹⁾

(¹⁾仲恺农业技术学院生命科学院,广州 510225; ²⁾中山大学生命科学学院,广州 510275)

摘要 以线粒体 16S rDNA 基因作为分子标记,对蝽总科 8 个科 23 种昆虫进行了系统发育的分析,并采用最大简约法、最大似然法和邻接法构建了分子系统树。结果表明:利用 16S rDNA 分子研究蝽总科的系统发育关系是适合的,能够重建蝽总科的单系性;土蝽科的位置不稳定,在蝽总科各科进化过程中处于中间位置;龟蝽科与蝽科在 MP 树和 ML 树中都形成姊妹群关系,在 NJ 树中 2 个科的亲缘关系也比较近;异蝽科是最早分支出来的,表明异蝽科是所研究类群中最为原始的类群。本研究从分子水平上支持了将荔蝽亚科、盾蝽亚科和兜蝽亚科从蝽科中分立出来提升为科的观点。

关键词 蝽总科; 16S rDNA; 分子系统发育; 蝽科; 土蝽科; 异蝽科

中图法分类号 Q 969.35⁺1 **文献标识码** A

蝽总科 Pentatomoidea 隶属半翅目 Hemiptera 异翅亚目 Heteroptera 蝽次目 Pentatomomorpha, 世界性分布,是半翅目中常见的大类群之一,绝大多数种类都是农林害虫。世界已知 4 100 种,我国有 360 种。对蝽总科的科级阶元的划分意见一直有较大分歧,有划分为 9 ~ 16 个科的意见。国外许多学者曾将盾蝽、荔蝽、兜蝽 3 个类群视为蝽科下设的亚科。近年来,较多学者根据形态构造上的一些特点,将它们从蝽科中划出,分别提升到科级水平^[1]。蝽总科昆虫的系统学研究,长期以来主要集中于形态学和生态学方面^[2,3]。

在分子系统发育研究方面,国内仅见代金霞和郑哲民对蝽科部分昆虫采用细胞色素 *b* 基因作了系统发育的探讨^[4];孙钦霞和张雅林对蝽亚科部分种类的 16S rDNA 基因序列的多态性作了研究^[5];卜云等基于线粒体 COII 基因对中国蝽科进行了分子系统学研究^[6];李红梅等首次对整个蝽次目利用分子标记 18S rDNA 基因和线粒体 COX1 基因进行的系统发育的探讨^[7],后来利用分子标记 18S rDNA 对蝽次目的系统发育作了研究^[8]。然而,对于蝽总科的分子系统发育研究则鲜见报道。笔者采用在昆虫系统发育研究中广泛使用的分子标记 16S rDNA

对 Cydnidae, Acanthosomatidae, Pentatomidae, Scutelleridae, Dinidoridae, Tessaratomidae, Urostylidae, Plataspidae 等科进行了分析,选取长蝽科 Lygaeidae 和缘蝽科 Coreoidea 作为外群,从分子水平探讨蝽总科的系统发育关系,旨在为今后的分类研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本研究包括蝽总科 8 个科共 23 个种,其中 6 个样品 2003 年采集于广东省;其余种的 16S rDNA 基因的同源序列来源于 GenBank(详见表 1),分类系统基于 Henry(1997)^[9]的分类法。以蝽次目长蝽科 Lygaeidae 的 *Spilostethus hospes* 和缘蝽科 Coreoidea 的 *Riptortus pedestris* 作为外群^[10]。

1.2 DNA 的提取、扩增和测序

昆虫总 DNA 提取采用试剂盒 EaZy Nucleic Acid Isolation Kit(购自 Omega Bio-tek)。总 DNA 的提取参照 Omega 公司提供的技术手册中所介绍的方法,具体操作如下:将 30 ~ 50 mg 的昆虫胸部肌肉剪碎,用液氮研磨成粉末;加入 ML1 Buffer,蛋白酶 K,60 孵育处理;加入氯仿 异戊醇 (24 1),

收稿日期:2006-03-29; 修回日期:2006-09-08

*广东省自然科学基金项目(04009785)资助

李红梅,女,1971 年生,博士,讲师。工作单位:仲恺农业技术学院植物保护系,广州 510225;E-mail:lihongmei0000@163.com

表 1 蟥总科昆虫的样品及 DNA 序列数据来源

Table 1 The sources of samples and DNA data of Pentatomoidea species

| 分类地位 ¹⁾ Current family classification | 种名 Taxa | GenBank 登陆号 ²⁾ Accession No. (GenBank) | 编号 Code |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------|
| 蟥总科 Pentatomoidea | | | |
| 盾蟥科 Scutelleridae | <i>Coleotichus costatus</i> | A Y252747 * | ScuCole |
| | 油茶宽盾蟥 <i>Poecilocoris latus</i> (Dallas) | A Y986800 | ScuPo1 |
| | <i>Choerocoris variegates</i> | A Y252748 * | ScuCho |
| 荔蟥科 Tessaratomidae | 荔蟥 <i>Tessaratomya papillosa</i> (Drury) | A Y986806 | TesTe2 |
| | <i>Peltopecta crassiventris</i> | A Y252693 * | TesPel |
| 龟蟥科 Plataspidae | 筛豆龟蟥 <i>Megacocta cribraria</i> (Fabricius) | A Y986805 | PlaMe3 |
| | <i>Plataspis coccinelloides</i> | A Y252663 * | PlaPla |
| 蟥科 Pentatomidae | 麻皮蟥 <i>Erthesina fullo</i> (Thunberg) | A Y986801 | PenEr5 |
| | <i>Tholosanus</i> sp. WCW-2003 | A Y252751 * | PenTho |
| | <i>Hypogomphus</i> sp. WCW-2003 | A Y252750 * | PenHyp |
| | <i>Brochymena</i> sp. WCW-2003 | A Y252655 * | PenBro |
| | <i>Ociirrhoe</i> sp. WCW-2003 | A Y252749 * | PenOci |
| | 同蟥科 Acanthosomatidae | 直同蟥 <i>Elasmotethus</i> sp. WCW-2003 | A Y252797 * |
| | 钝肩直同蟥 <i>Elasmotethus scotti</i> Renter | A Y986804 | AcaElas33 |
| | <i>Stauralia compuncta</i> | A Y252741 * | AcaStau |
| | <i>Stauralia chloracantha</i> | A Y252740 * | AcaStauCh |
| | <i>Anischys</i> sp. WCW-2003 | A Y252742 * | AcaAni |
| | <i>Anischys luteovarius</i> | A Y252744 * | AcaAniL |
| 土蟥科 Cydnidae | <i>Amphaces</i> sp. WCW-2003 | A Y252743 * | AcaAmp |
| 兜蟥科 Dimidiidae | <i>Allocoris</i> sp. WCW-2003 | A Y252798 * | CydAll |
| 异蟥科 Urostylidae | 瓜蟥 <i>Megymenum</i> sp. WCW-2003 | A Y252697 * | DinMegy |
| 缘蟥总科 Coreoidea | 狡异蟥 <i>Urostylis</i> sp. | A Y986799 | UroUroD |
| 缘蟥科 Coreidae | <i>Urostylis westwoodi</i> | A Y252689 * | UroUros |
| 长蟥总科 Lygaeoidea | 点蜂缘蟥 <i>Riptortus pedestris</i> (Fabricius) | A Y986811 | CoAlyR12 |
| 长蟥科 Lygaeidae | 箭痕腺长蟥 <i>Spilostethus hospes</i> (Fabricius) | A Y986808 | LygS10 |

1) 总科和科的分属根据 Henry (1997) 的意见 Classification follows Henry (1997) ;

2) * :来自 Wheeler & Schuh(2004) 直接提交 GenBank Direct submission to NCBI GenBank database by Wheeler and Schuh

10 000 r/min 离心;取上清液加入异丙醇沉淀 DNA,10 000 r/min 离心后弃上清液,空气干燥;加入双蒸水重新溶解沉淀物 DNA,加入 RNase A (20 mg/mL) 混匀;加入 ML2 Buffer,无水乙醇颠倒混匀;转移所有的溶液至 HiBind DNA 柱子,8 000 r/min 离心弃液体;加入 DNA Wash Buffer,8 000 r/min 离心弃液体;把柱子置于干净的离心管中,加入 DNA 水化溶液,8 000 r/min 离心,收集 DNA。

扩增线粒体 16S rDNA 基因片段的引物设计参考 Simon 等^[11]。引物序列为 LR-J-12887 (16Sbr): 5'-CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG-3', LR-N-13398 (16Sar): 5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC ATG-3'。

反应体系为 25 μ L: 2~6 μ L DNA, 0.5 U Taq DNA 聚合酶, 1.5 μ L 的 10 μ mol/L 引物 1 对, 2.0 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 2.5 μ L 10 \times buffer 扩增条件为 95 预变性 5 min 后,按下列参数进行 35 个循环: 95 变性 30 s, 48 退火 60 s, 72 延伸 1.5 min,最后 1 个循环后,72 再延伸 8 min。PCR 产物进行凝胶电泳,切割并用 DNA 凝胶回收试剂盒(QIA GEN 公司)回收该片段。采用 PE 公司 377

型自动测序仪进行测序。

1.3 DNA 序列数据处理

序列的编辑和拼接按 SEQED (applied biosystems) 完成,所测序列均已全部提交 GenBank。序列的比对采用 Clustal-X 软件包^[12]进行。16S rDNA 序列在比对时还采用手工进行调整,并参考昆虫的 16S rRNA 3 端的二级结构模型^[13]。通过比较,发现 16S rDNA 序列中存在一些高度可变区,有些可变区在所有的分类群中比对相对困难,这些区域在分析时予以排除。比对好的序列见 http://life.zsu.edu.cn/insect_16S_rDNA/。利用 MEGA 2.0 估计转换/颠换比率;核苷酸替换饱和水平通过 p 距离(未校正距离)对 Kimura 双参数模式的校正距离(2 $P+$)作图来估计。

系统发育的分析均采用 PAUP* 4.010b 进行。建树方法采用邻接法(neighbor-joining, NJ),最大简约分析(maximum parsimony, MP)和最大似然分析(maximum likelihood, ML)。系统树各分支的相对支持率采用文献[14]中的方法进行检验。最大似然分析所用参数由 MrModeltest 估计,然后用 PAUP* 4.010b 构建系统树。

最大似然搜索所用参数由 MrModeltest 估计, $\text{freqA} = 0.3175$, $\text{freqC} = 0.0905$, $\text{freqG} = 0.1630$, $\text{freqT} = 0.4290$; $I = 0.3323$; $\gamma = 0.9493$ 。然后用 PAUP* 4.010b 构建系统树。

2 结果与分析

2.1 序列特点

本研究测定了半翅目蝽总科 6 个供试样品的 16S rDNA 序列(A Y986799-A Y986801, A Y986804-A Y986806),同时还测定了作为外群的长蝽科 Lygaeidae *Spilostethus hospes* 和缘蝽科 Coreoidea *Riptortus pedestris* 的 16S rDNA 序列(A Y986808 和 A Y986811);其余 17 个 16S rDNA 基因的同源序列来源于 GenBank。所利用的这段序列是经常在昆虫群体遗传学和系统发育研究中所用线粒体 16S rDNA 的 3 端的片段,使用非常保守的引物 LR-J-12887 (16Sbr) 和 LR-N-13398 (16Sar) 来扩增,位于 16S rRNA 二级结构的和区域。其中螺旋 75 (helix75) 的保守性最差,其长度和二级结构高度可变,在其他的动物此段也是高度可变区^[15]。因此,在系统发育分析中常常排除此段高度可变区^[13]。本研究也排除了这段区域。

经过比对后,用于建树分析的数据矩阵共有 477 bp,其中有 252 个变异位点(占总位点的 52.83%),有 184 个信息位点(占总变异位点的 73.01%)。碱基平均成分为(2P+): T 40.1%, C 10.6%, A 31.0%, G 18.3%,碱基组成明显具有偏好性,其中富含 A, T 碱基(A + T = 71.1%),这是昆虫线粒体 DNA 序列的一个共同特征。核苷酸替换饱和水平通过 p 距离(未校正距离)对 Kimura 双参数模式的校正距离(2P+)作图来估计,结果说明只是在亲缘关系较远的物种有一定程度的饱和现象(图未画出)。

2.2 系统发育关系

利用 16S rDNA 基因用最大简约分析(MP),最大似然分析(ML)和邻接法(NJ)都能够重建蝽总科的单系性(图 1)。最大简约分析对所有的位点和替换都等权(未加权),得到 6 棵最大简约树(Length = 871, CI = 0.433, RI = 0.416),图 1-A 是严格一致树的结果。

从分子系统树中可以看出蝽总科有 3 个大的聚类簇,异蝽科首先与其他类群分离开,构成聚类簇;同蝽科的 3 个属聚为 1 个单系,为聚类簇;而

盾蝽科,荔蝽科,龟蝽科,蝽科,土蝽科,兜蝽科聚为并列的 1 支,为聚类簇。

在聚类簇中,龟蝽科、蝽科的亲缘关系较近,组成姊妹群关系,而盾蝽科为 1 个单系。最大似然树(ML)(图 1-B)分为 6 个聚类簇,与 MP 树的 3 个大的聚类簇相比,各物种的聚类关系基本一致,但在系统树分支上有所不同。其中 MP 树中的聚类簇在 ML 树中被细分为 4 支:龟蝽科和蝽科组成姊妹群(),单系的盾蝽科(),土蝽科的 *Allocoris* sp. WCW-2003 成单独的 1 支(),而兜蝽科和荔蝽科的荔蝽 *Tessarotoma papillosa* 聚成 1 支(),但是,荔蝽科的另一物种 *Peltocopta crassiventris* 却自成 1 个分支。NJ 分子系统树(图 1-C)与 ML 树相似,各分支的自展值有所提高,但龟蝽科()与蝽科()不形成姊妹群关系,土蝽科、兜蝽科和荔蝽科聚成 1 支()。

3 讨论

本研究对蝽总科部分种类线粒体 16S rDNA 部分序列进行了初步比较,结果表明利用 16S rDNA 基因能够重建蝽总科的单系性,这与现有的基于形态学和分子系统发育学的研究是一致的^[1, 7, 8]。

各科间的亲缘关系与传统的分类系统有同有异。土蝽科的位置不稳定,该科并不是最早从蝽总科的主干上分支出来的,而在蝽总科各科进化过程中处于中间位置,这与徐志强以形态特征进行的支序分析有所差别^[3],与 Gapud 的分析一致^[2]。

重建的 MP、ML 和 NJ 系统树显示异蝽科是最早分支出来的,表明异蝽科是所研究类群中最为原始的类群,这与 Gapud 的分析一致^[2]而与徐志强的分析有所不同^[3]。龟蝽科与蝽科在 MP 树和 ML 树中都形成姊妹群关系,在 NJ 树中,2 个科的亲缘关系也比较近,这与若干已有的系统学意见比较一致。

Kumar 认为龟蝽科的雄性外生殖器基型与蝽科很接近^[16]。而徐志强的分析认为龟蝽科在蝽总科的系统发育中是独立演化的一支^[3]。在现行的分类系统中,多数学者同意将荔蝽亚科、盾蝽亚科和兜蝽亚科从蝽科中分立出来并提升为科^[1]。本研究结果表明盾蝽科与兜蝽科和荔蝽科的亲缘关系比较接近,而蝽科为一单系群,由此很好地从分子水平上支持了此观点。

本研究结果还表明,将 16S rDNA 序列作为遗传标记,运用于蝽总科的分类系统研究是合适的。

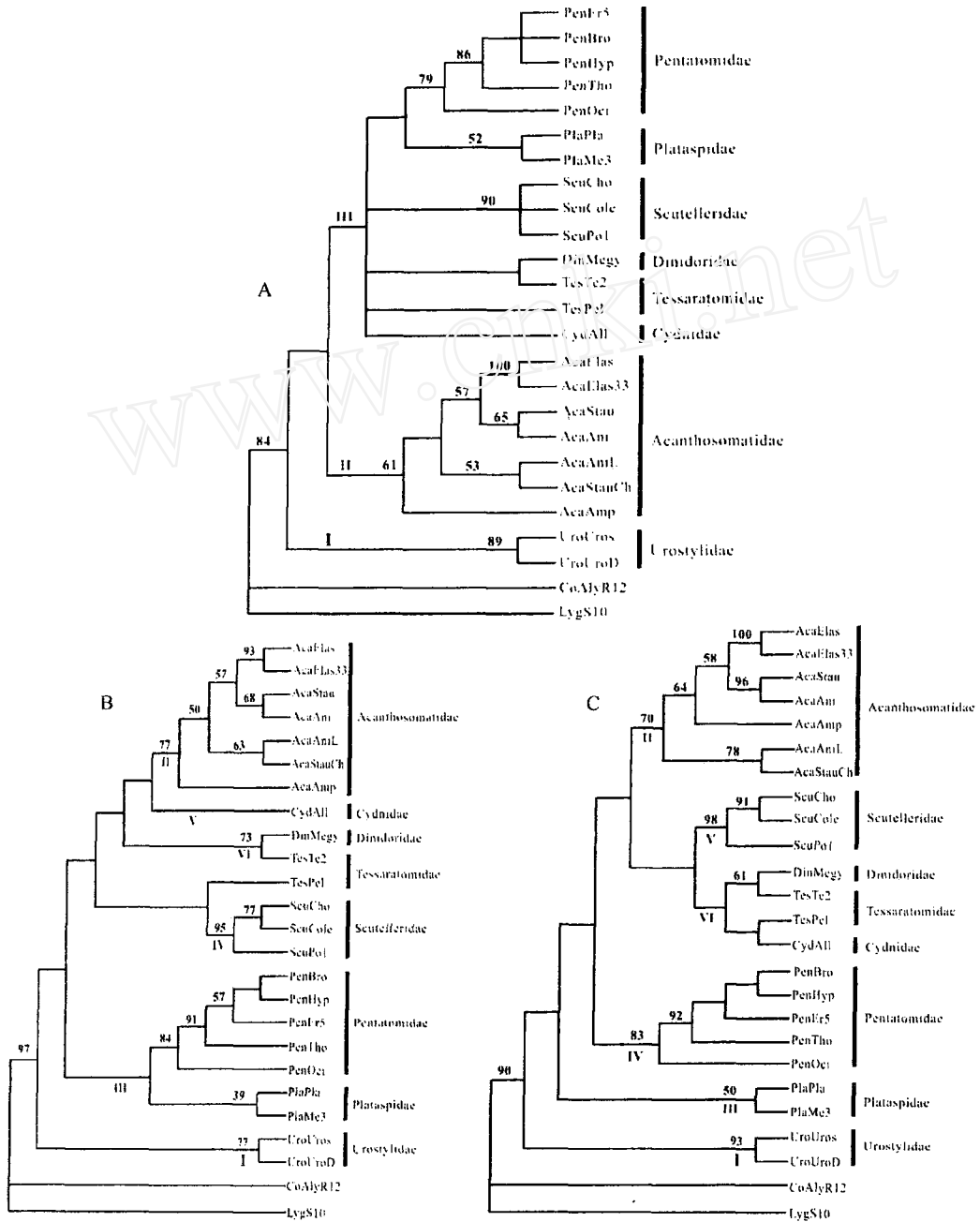


图 1 蝽总科 16S rDNA 序列重建的严格一致 MP 树 (A)、ML 树 (B) 和 NJ 树 (C)

Fig. 1 The phylogenetic trees of Pentatomomorpha according to 16S rDNA sequences (A) using Maxium Parsimony (MP), using Maximum Likelihood (B) and using neighbor-joining (NJ) (C)

树节点上的数字表示 Bootstrap 值,总科和科的分属根据 Henry (1997)的意见表示在树右侧

Bootstrap values are shown above nodes,current superfamily and family taxa following Henry (1997) are indicated on the right

在进一步的研究中,应增加样本的种类和数量,使其更具代表性。同时,应延长 DNA 序列的长度以包含更大的遗传信息。

致谢 衷心感谢中山大学生命科学学院陈振耀教授、贾凤龙老师和庞红老师提供并鉴定标本!

参 考 文 献

[1] SCHUH R T,SLATER J A. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history[M]. NY: Cornell University Press, 1995.

[2] GAPUD V P. A generic revision of the subfamily Asopinae,

- with consideration of its phylogenetic position in the family Pentatomoidea and superfamily Pentatomoidea (Hemiptera: Heteroptera) [J]. *Philipp Entomol*, 1991, 8(3): 865-961.
- [3] 徐志强. 蟾总科科间支序分析及系统发育[J]. *北京农业大学学报*, 1993, 19(2): 49-53.
- [4] 代金霞, 郑哲民. 蟾科部分昆虫细胞色素 b 基因序列及其系统发育关系的探讨[J]. *动物学研究*, 2004, 25(5): 397-402.
- [5] 孙钦霞, 张雅林. 七种蟾 mtDNA-16S rDNA 基因序列多态性的研究[J]. *昆虫分类学报*, 2004, 26(2): 107-113.
- [6] 卜云, 栾云霞, 郑哲民. 基于线粒体 CO 基因的中国蟾科分子系统学研究(半翅目: 翅亚目) [J]. *动物分类学报*, 2006, 31(2): 239-246.
- [7] LI H M, DENG R Q, WANG J W, et al. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 37: 313-326.
- [8] 李红梅, 邓日强, 王均章. 基于 18S rDNA 序列的蟾次目(半翅目: 异翅亚目) 系统发育关系 [J]. *动物学研究*, 2006, 27(3): 307-316.
- [9] HENRY T J. Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea [J]. *Ann Entomol Soc Am*, 1997, 90: 275-301.
- [10] WHEELER W C, SCHUR T, BANGR R. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets [J]. *Entomologica Scandinavica*, 1993, 24: 121-137.
- [11] SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Entomol Soc Am*, 1994, 87: 651-701.
- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [13] BUCKLEY T R, SIMON C, FLOOK P K, et al. Secondary structure and conserved motifs of the frequently sequenced domains IV and V of the insect mitochondrial large subunit rRNA gene [J]. *Insect Molecular Biology*, 2000, 9: 565-580.
- [14] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [15] ORTI G, Petry P, Porto JIR, et al. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas [J]. *J Mol Evol*, 1996, 42: 169-182.
- [16] KUMAR R. Morpho-taxonomical studies on the genitalis and salivary glands of some Pentatomoidea [J]. *Entomol Ts Arg*, 1962, 83: 44-84.

Phylogenetic Relationships of the Pentatomoidea Based on the Mitochondrial 16S rDNA Sequences (Heteroptera: Pentatomomorpha)

LI Hong-mei¹⁾ WANG Xun-zhang²⁾ LIN Jintian¹⁾

¹⁾ Department of Plant Protection, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China;

²⁾ College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Sequences of mitochondrial 16S rDNA gene were used to generate a molecular phylogeny for the Pentatomoidea based on 23 species representing 8 putative families. Phylogenetic analyses using MP (maximum parsimony), ML (maximum likelihood) and NJ (neighbor-joining) showed that 16S rDNA was a proper marker to reconstruct the phylogeny of Pentatomoidea. The results strongly supported that the Pentatomoidea lineage was monophyly. The position of Cydnidae was not certain, which would locate at the middle in the evolution process of the Pentatomoidea families. In MP tree and ML tree, Cydnidae and Pentatomidae were sister group formed a close relationship in NJ tree. Urostylidae appeared to form an early clade and be basal to all sampled Pentatomoidea. The study supported the view that Scutelleridae, Dinidoridae and Tessaratomidae should be separated from family Pentatomidae and be three valid families.

Key words Pentatomoidea; 16S rDNA; molecular phylogeny; Pentatomidae; Cydnidae; Urostylidae

(责任编辑: 陈红叶)